

Air soda





© BSN 2015

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar Isi

Daftar Isi	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup	1
2 Acuan normatif	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	1
5 Syarat mutu	2
6 Pengambilan contoh	2
7 Cara uji	2
8 Syarat lulus uji	3
9 Higiene	3
10 Pengemasan	3
11 Syarat penandaan	3
Lampiran A	4
Bibliografi	19
Tabel 1 – Syarat mutu air soda	2

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Air soda* ini merupakan revisi dari SNI 01-3708-1995, *Air soda*. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

1. Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam persyaratan mutu dan metode uji;
2. Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
3. Melindungi kesehatan dan kepentingan konsumen;
4. Menjamin perdagangan pangan olahan yang jujur dan bertanggung jawab;
5. Mendukung perkembangan produk industri minuman ringan.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan ketentuan pada:

1. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No. 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No. 18 Tahun 2012 tentang Pangan.
4. Undang-Undang Republik Indonesia No. 3 Tahun 2014 tentang Perindustrian.
5. Undang-Undang Republik Indonesia No. 20 Tahun 2014 tentang Standardisasi dan Penilaian Kesesuaian
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
7. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
8. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 416/MENKES/PER/IX/1990 tentang Syarat-syarat dan Pengawasan Kualitas Air.
9. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No. 75/M-IND/PER/7/2010 tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik (*Good Manufacturing Practices*).
10. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 033 Tahun 2012 tentang Bahan Tambahan Pangan.
11. Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
12. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

Standar ini dirumuskan oleh **Subkomite Teknis 67-04-S1, Minuman, Kementerian Perindustrian** yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 25 Februari 2014 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada 27 Februari 2015 sampai 26 April 2015 dengan perpanjangan 1 (satu) bulan sampai tanggal 25 Mei 2015 dengan hasil akhir RASNI.

Air soda

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji air soda.

2 Acuan normatif

Pedoman ini tidak dapat dilaksanakan tanpa menggunakan dokumen referensi di bawah ini. Untuk acuan bertanggal, hanya edisi yang disebutkan yang berlaku. Untuk acuan yang tidak bertanggal, edisi terakhir dari (termasuk amandemen lain) yang berlaku.

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

SNI ISO 6887-1, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 1: Aturan umum untuk penyiapan suspensi awal dan pengenceran desimal*.

SNI ISO 6888-1, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metoda horizontal untuk enumerasi staphylococci koagulasi-positif (Staphylococcus aureus dan spesies lain) – Bagian 1: Teknik menggunakan Baird – Parker agar*.

SNI ISO 21527-1, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk enumerasi kapang dan khamir – Bagian 1: Teknik penghitungan koloni pada produk dengan aktivitas air lebih besar dari 0,95*.

3 Istilah dan definisi

3.1

air soda

air minum yang mengandung karbondioksida (CO₂), pengatur keasaman dan/atau garam mineral tanpa bahan pangan lainnya

4 Komposisi

4.1 Bahan baku

Air yang telah memenuhi persyaratan air bersih sesuai dengan ketentuan yang berlaku dan karbondioksida (CO₂).

4.2 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diizinkan sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

5 Syarat mutu

Syarat mutu air soda sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 – Syarat mutu air soda

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	normal
1.2	Rasa	-	normal
1.3	Warna	-	tidak berwarna
2	Karbondioksida (CO ₂)	fraksi massa (%)	di atas 0,589 – 0,900
3	Padatan terlarut	mg/L	maks. 500
4	Cemaran logam		
4.1	Kadmium (Cd)	mg/L	maks. 0,003
4.2	Timbal (Pb)	mg/L	maks. 0,005
4.3	Timah (Sn)	mg/L	maks. 40,0 maks. 150,0*
4.4	Merkuri (Hg)	mg/L	maks. 0,001
5	Cemaran arsen (As)	mg/L	maks. 0,01
6	Cemaran mikroba		
6.1	Angka Lempeng Total	koloni/mL	maks. 1×10^2
6.2	<i>Coliform</i>	koloni/100 mL	maks. 1
6.3	<i>Salmonella sp</i>	-	negatif / 100 mL
6.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	negatif / mL
6.5	Kapang dan khamir	koloni/mL	maks. 1×10^2
CATATAN: * untuk produk yang dikemas dalam kaleng			

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

7 Cara uji

Cara uji untuk air soda seperti di bawah ini:

- a) Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
 - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
 - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.2
 - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.3
- c) Cara uji karbondioksida sesuai Lampiran A.3
- d) Cara uji padatan terlarut sesuai Lampiran A.4
- e) Cara uji cemaran logam:
 - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran A.5.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.5.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.5.3
- f) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.6
- g) Cara uji cemaran mikroba :
 - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai SNI ISO 6887-1:2012
 - Cara uji Angka Lempeng Total sesuai Lampiran A.7.1

- Cara uji Bakteri *Coliform* sesuai Lampiran A.7.2
- Cara uji *Salmonella sp* sesuai Lampiran A.7.3
- Cara uji *Staphylococcus aureus* sesuai SNI ISO 6888-1: 2012
- Cara uji kapang dan khamir sesuai SNI ISO 21527-1:2012

8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Tabel 1.

9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

10 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

11 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.

Lampiran A (Normatif)

Cara uji air soda

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Kocok air soda yang masih ada di dalam kemasan menggunakan tangan atau peralatan mekanis untuk menjamin bahwa mikroba terdistribusi secara merata, kemudian buka kemasan contoh air soda, ambil contoh secara aseptik secukupnya, dan tempatkan dalam botol contoh steril.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan contoh air soda dan ambil contoh secukupnya kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering

A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia

Persiapan contoh untuk uji kimia dibagi menjadi dua, yaitu persiapan contoh untuk uji kandungan CO₂ dan uji kimia selain CO₂. Untuk uji CO₂, kemasan contoh air soda jangan dibuka, sedangkan untuk uji kimia selain CO₂, maka buka kemasan contoh air soda dan ambil contoh secukupnya, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.2 Keadaan

A.2.1 Bau

A.2.1.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.1.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimum oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.2 Rasa

A.2.2.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.2.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- b) lakukan pengerjaan minimum oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

2.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.3 Warna

A.2.3.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.3.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) lihat contoh uji untuk mengetahui warnanya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimum oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

Catat warna yang terlihat.

A.3 Karbondioksida (CO₂)

A.3.1 Prinsip

CO₂ dalam air soda ditentukan berdasarkan prinsip pengukuran tekanan.

A.3.2 Peralatan

a) *Piercing apparatus*;

Untuk botol : terdiri dari kotak pembungkus kedap udara dan kencangkan untuk penyesuaian wadah atas dan taji berongga yang dihubungkan pada alat pengukur tekanan yang akurat dan katub outlet. Periksa alat ini secara rutin.

Untuk kaleng : Terdiri dari bingkai logam dimana kaleng ditempatkan. Bagian atas peralatan, yang ditekan atau disekrup bagian bawah dan dikunci di sekitar bagian atas kaleng, terdiri dari taji berongga yang dikelilingi oleh sumbat karet mampat, taji berongga yang mengarah ke alat pengukur tekanan akurat dan katub outlet.

b) Buret absorpsi (Gambar A.1);

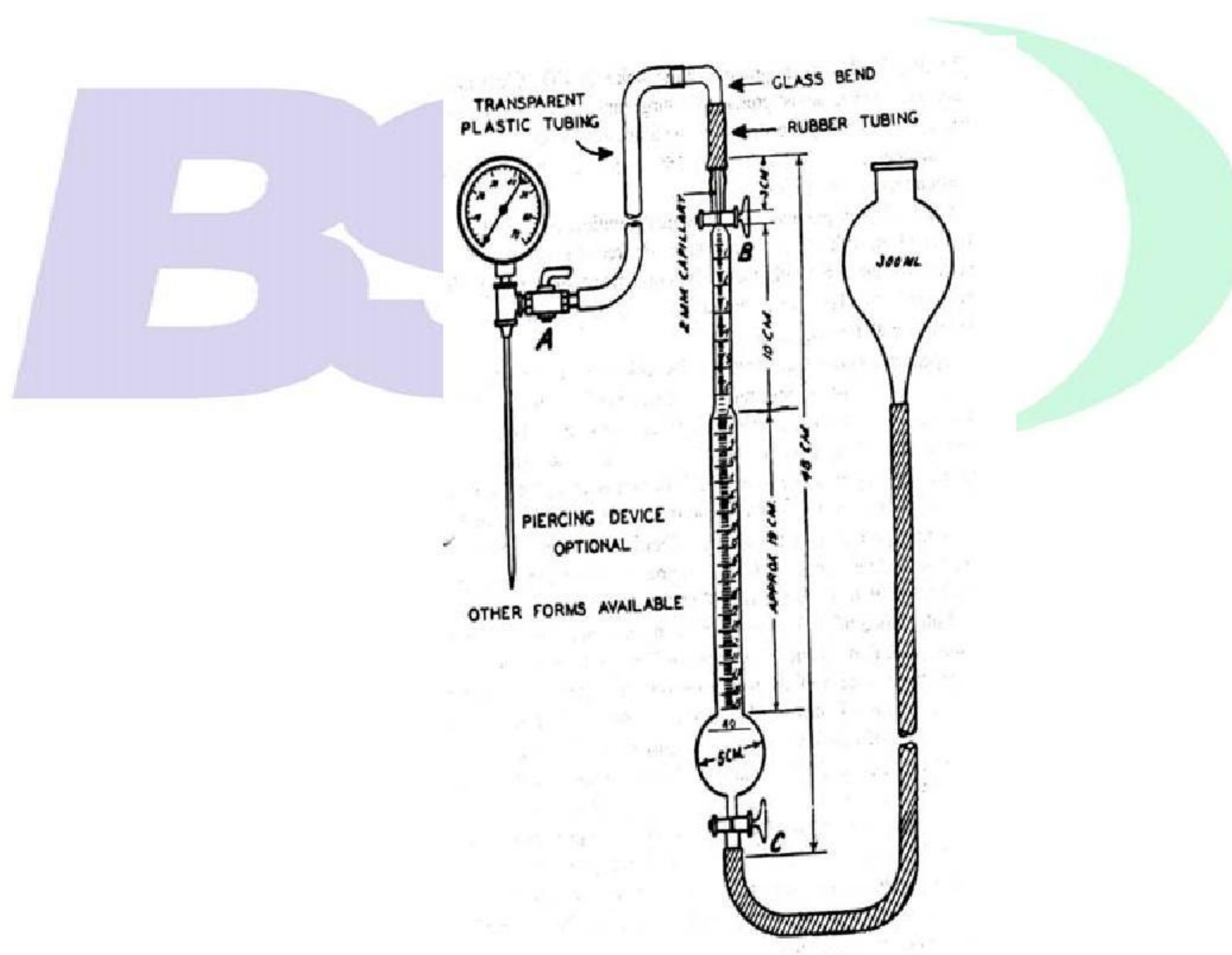
Terdiri dari tabung pengukur (salah satu tipe memiliki ukuran 0-5 mL dengan skala 0,05 mL, 5-5 mL dengan skala 0,1 mL dan 15-25 mL dengan skala 0,5 mL) dengan labu yang diberi tanda pada 40 mL, dan ditutup pada setiap akhir dengan kunci pipa. Hubungkan buret ke katub *piercing apparatus* dan ke labu pengukur dengan plastik yang tahan alkali atau tabung karet.

c) Labu pengukur dengan kapasitas 300 mL;

d) Penangas air, 25 °C;

e) Neraca dengan kapasitas 500 g sampai dengan 1 000 g;

f) Termometer.



Gambar A.1 – Buret absorpsi

A.3.3 Pereaksi

- a) Natrium hidroksida, NaOH 15 %;
- b) H₂O.

A.3.4 Cara kerja

- a) Dinginkan contoh uji hingga temperatur 25 °C pada penangas air bertemperatur 25 °C. Bila contoh di dalam kemasan botol, beri tanda pada botol yang menunjukkan permukaan contoh. Bila contoh dalam kemasan kaleng, timbang kaleng yang belum dibuka;
- b) isi labu pengukur dan buret absorpsi dengan larutan NaOH 15 %. Pindahkan udara di tabung penghubung ke *piercing apparatus* dengan H₂O atau larutan NaOH dan tempelkan perangkat *piercing* ke botol atau kaleng;
- c) perhatikan bahwa tidak ada udara yang terperangkap pada sistem yang akan dibawa ke dalam buret selama pengukuran;
- d) dengan membuka katub perangkat *piercing*, tusuk mahkota botol atau kaleng dengan menekan taji besi berongga;
- e) kocok botol atau kaleng sampai tekanannya mencapai nilai maksimum yang konstan;
- f) hentikan pengocokan dan catat tekanannya ;
- g) buka katub pada *piercing apparatus* dan biarkan campuran busa gas mengalir ke buret absorpsi sampai alat pengukur tekanan menunjukkan nilai nol;
- h) tutup katub dan kocok buret sampai CO₂ diabsorpsi dan volume gas di buret mencapai nilai minimum. Tepatkan gelas ukur dan samakan tekanan hidrostatik dan baca volume "udara *headspace*" yang ada dalam buret;
- i) bila penentuan udara total juga diinginkan, lanjutkan pengembangan gas dari botol atau kaleng dengan mengocoknya;
- j) absorpsi gas CO₂ yang berkembang dengan memutar dan mengocok buret;
- k) lanjutkan pengocokan dan langkah absorpsi CO₂ sampai tidak ada pengembangan volume lebih lanjut gas yang tidak terabsorpsi dalam buret. Volume akhir gas yang tidak terabsorpsi dianggap sebagai kandungan udara atau udara total wadah;
- l) putuskan sambungan peralatan *piercing* dari perangkatnya dan periksa temperatur;
- m) tentukan volume *headspace* contoh seperti berikut ini:

Untuk botol : Isi botol sampai atas dengan air dan tuangkan dari botol dengan ukuran 100 mL sampai batas cairan di botol sesuai dengan tanda yang dibuat sebelum penentuan CO₂. Volume cairan yang dituangkan (dalam mL) adalah volume *headspace* dalam botol (dalam mL)

Untuk kaleng : Kosongkan air soda dari kaleng yang sudah ditimbang dan biarkan mengering hingga sempurna. Kurangi berat kaleng kosong dari berat kaleng air soda dari kaleng yang belum terbuka untuk mendapatkan berat air soda dari kaleng sebelum membuka kaleng. Bagi berat air soda dari kaleng dengan berat jenis air soda dari kaleng untuk mendapatkan volume air soda dari kaleng dalam mL. Kurangi berat kaleng kosong dari berat kaleng berisi H₂O. Perbedaannya adalah berat H₂O, ekuivalen dengan volume H₂O. Kurangkan volume air soda dari kaleng untuk mendapatkan *headspace* di kaleng.

A.3.5 Perhitungan

$$\text{CO}_2 (\% \text{ b/b}) = \{ P - (\text{mL udara headspace} \times 14,7/\text{mL headspace}) \} \times 0,00965$$

Keterangan :

P adalah tekanan absolut (psi) = tekanan pada alat pengukur tekanan (psi) + 14,7;

0,00965 adalah jumlah CO₂ (g) pada tekanan absolut per 100 g contoh.

A.4 Padatan terlarut

A.4.1 Prinsip

Contoh yang sudah diaduk sempurna, diuapkan, ditimbang dan dikeringkan sampai bobot tetap dalam oven pada temperatur 103°C sampai dengan 105°C. Penambahan bobot dalam pinggan menunjukkan jumlah zat yang terlarut.

A.4.2 Peralatan

- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg ;
- Oven pengering (103°C sampai dengan 105°C);
- Pinggian penguap dengan kapasitas 100 mL yang terbuat dari porselin;
- Penangas air;
- Desikator yang berisi silika gel;
- Kertas saring berpori 0,45 mm;
- Pipet 50 mL;
- Desikator yang berisi desikan.

A.4.3 Cara kerja

- Panaskan pinggan penguap bersih pada temperatur 103°C - 105°C selama 1 jam pada oven, dinginkan dalam desikator, kemudian ditimbang sampai bobot tetap (W₁) ;
- pipet sebanyak 50 mL contoh yang telah diaduk dan disaring dengan kertas saring berpori 0,45 mm, pindahkan ke dalam pinggan yang telah ditimbang terlebih dahulu dan uapkan sampai kering di atas penangas atau di dalam oven pengering. Bila menggunakan oven pengering turunkan temperatur 2°C di bawah titik didih untuk menghindari pemercikan;
- masukkan contoh yang telah dikeringkan ke dalam oven pada temperatur 103°C sampai dengan 105°C selama 1 jam, dinginkan pinggan dalam desikator dan selanjutnya ditimbang (W₂). Ulangi pengerjaan tersebut sampai diperoleh bobot tetap.

A.4.4 Perhitungan

$$\text{Total padatan terlarut (mg/L)} = \frac{(W_2 - W_1)}{V} \times 1000$$

Keterangan :

W₂ adalah bobot cawan dan sisa pengeringan, dinyatakan dalam miligram (mg);

W₁ adalah bobot cawan kosong, dinyatakan dalam miligram (mg);

V adalah volume contoh, dinyatakan dalam mililiter (mL).

A.5 Cemaran logam

A.5.1 Kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

A.5.1.1 Prinsip

Atomisasi dalam *graphite furnace* yang dihubungkan dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang telah dikalibrasi menggunakan standar Cd pada panjang gelombang maksimum 228,8 nm dan larutan standar Pb pada panjang gelombang 283,3 nm.

A.5.1.2 Peralatan

- SSA *graphite furnace*;
- Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10;
- Saringan membran 0,45 μm ;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1000 mL;
- Pipet ukur 10 mL dan 100 mL;
- Tabung reaksi 20 mL;
- Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- Penangas listrik.

A.5.1.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam;
Air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- Asam nitrat, HNO_3 p.a;
- Larutan induk Cd 1 000 mg /L;
- Larutan baku Cd 1 mg/L;
Pipet 1 ml larutan baku Cd 1 000 ml/L kedalam labu ukur 1 000 mL tambah air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- Larutan standar Cd; 0 $\mu\text{g/L}$; 2,5 $\mu\text{g/L}$; 5 $\mu\text{g/L}$; 7,5 $\mu\text{g/L}$ dan 10 $\mu\text{g/L}$;
Pipet masing-masing 0 mL; 0,25 mL; 0,5 mL; 0,75 mL dan 1 mL larutan baku Cd 1 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- Larutan induk Pb 1 000 mg /L;
- Larutan baku Pb 10 mg/L;
Pipet 1 mL larutan baku Pb 1 000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambah air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- Larutan Standar Pb; 0 $\mu\text{g/L}$; 10 $\mu\text{g/L}$; 40 $\mu\text{g/L}$ dan 80 $\mu\text{g/L}$.
Pipet masing-masing 0 mL; 0,10 mL; 0,20 mL; 0,40 mL dan 0,80 mL larutan baku Pb 10 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.5.1.4 Persiapan contoh

- Saring larutan contoh 50 mL sampai 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μm ;
- Asamkan contoh sampai $\text{pH} < 2$ dengan HNO_3 p.a;
- Bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas penangas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL;

- d) Pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis;
- e) Contoh siap diuji.

A.5.1.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan SSA *graphite furnace*.

A.5.1.6 Perhitungan

Hitung kadar Cd dan Pb dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

A.5.2 Timah (Sn)

A.5.2.1 Prinsip

Contoh didekstruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

A.5.2.2 Peralatan

- a) SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) ;
- b) Tanur dengan ketelitian 1 °C;
- c) Penangas air;
- d) Pemanas listrik;
- e) Saringan membran 0,45 µm;
- f) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- g) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL;
- h) Pipet ukur berskala 10 mL kapasitas 5 mL dan 0,1 mL;
- i) Erlenmeyer 250 mL;
- j) Gelas ukur kapasitas 50 mL; dan
- k) Gelas piala 250 mL.

A.5.2.3 Pereaksi

- a) Larutan kalium klorida (KCl), 10 mg/mL K; larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 mL.
- b) Asam nitrat (HNO_3) p.a;
- c) Larutan baku 1 000 µg/mL Sn; dan larutkan 1, 000 g Sn dengan 200 mL asam HCl pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada temperatur ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- d) Larutan baku kerja Sn. pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1 000 µg/mL Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL; 15 µg/mL; 20 µg/mL dan 25 µg/mL Sn.

A.5.2.4 Persiapan contoh

- Saring larutan contoh 50 mL sampai 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μm ;
- asamkan contoh sampai $\text{pH} < 2$ dengan HNO_3 p.a;
- bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas penangas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL;
- pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, tambahkan 1 mL KCl, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis;
- contoh siap diuji.

A.5.2.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan SSA .

A.5.2.6 Perhitungan

Hitung kadar Sn dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

A.5.3 Merkuri (Hg)

A.5.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH_4 atau SnCl_2 dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbansi Hg yang dibaca menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.

A.5.3.2 Peralatan

- SSA yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap dingin (*cold vapour*);
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- Penangas air;
- Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL;
- Saringan membran 0,45 μm ;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1000 mL;
- Pipet ukur 10 mL dan 100 mL;
- Tabung reaksi 20 mL;
- Gelas piala 150 mL dan 500 mL.

A.5.3.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam;
Air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- Asam sulfat (H_2SO_4) p.a;
- Asam nitrat (HNO_3) p.a;
- Larutan kalium permanganat, KMnO_4 , 5%;
Larutkan 50 g KMnO_4 dalam labu ukur 1 L dengan air suling, encerkan dan tera sampai tanda garis.
- Larutan kalium persulfat, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, 5%;
Larutkan 50 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ dalam labu ukur 1 L dengan air suling, encerkan dan tera sampai tanda garis.
- Larutan Natrium klorida hidroksil-amin sulfat, $(\text{NH}_2\text{OH})\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$;

- g) Larutkan 120 g NaCl dan 120 g $(\text{NH}_2\text{OH})_2\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$ dalam labu ukur 1 L dengan air suling, encerkan sampai tanda garis;
- h) Larutan Natrium borohidrida NaBH_4 ;
Larutkan 8 g NaBH_4 dengan 200 mL NaOH 0,1 N. Larutan ini harus segar.
- i) Larutan induk 1 000 mg/L Hg;
- j) Larutan baku 1 mg/L Hg;
Pipet 1 mL larutan induk Hg 1 000 mg/L ke dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- k) Larutan standar Hg 0 $\mu\text{g/L}$; 1 $\mu\text{g/L}$; 2 $\mu\text{g/L}$; 3 $\mu\text{g/L}$; 4 $\mu\text{g/L}$ dan 5 $\mu\text{g/L}$.
Pipet masing-masing 0 mL; 0,1 mL; 0,2 mL; 0,3 mL; 0,4 mL; dan 0,5 mL larutan baku Hg 1 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL, tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis. Larutan standar harus selalu segar.

A.5.3.4 Cara kerja

- a) Ukur dengan teliti 100 mL contoh dan air suling bebas logam sebagai blangko ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL;
- b) tambahkan 5 mL H_2SO_4 p.a 2,5 mL HNO_3 dan 15 mL larutan KMnO_4 ke dalam contoh larutan standar dan blangko, biarkan paling sedikit 15 menit;
- c) tambah 8 mL larutan $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ dan panaskan selama 2 jam dalam penangas air pada temperatur 95 °C;
- d) Dinginkan pada temperatur ruang dan tambah 6 mL larutan $(\text{NH}_2\text{OH})_2\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$ untuk mengurangi kelebihan permanganat;
- e) Periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan SSA.

A.5.3.5 Perhitungan

Hitung kadar merkuri dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis linier

A.6 Cemarkan arsen (As)

A.6.1 Prinsip

Analisis cemarkan As dengan SSA menggunakan lampu katoda As berdasarkan pada penyerapan energi radiasi oleh asam-asam yang berbeda-beda pada tingkat dasar.

A.6.2 Peralatan

- a) SSA dengan generator uap hidrida;
- b) Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL;
- c) Saringan membran 0,45 μm ;
- d) Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL;
- e) Pipet ukur 10 mL dan 100 mL;
- f) Tabung reaksi 20 mL;
- g) Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- h) Pemanas listrik.

A.6.3 Pereaksi

- a) Air suling bebas logam;
Air yang telah mengalami 2 kali penyulingan.
- b) Asam nitrat, HNO_3 p.a;
- c) Larutan induk arsen 1 000 mg/L;

- d) Larutan baku arsen 1 mg/L;
Pipet 1 ml larutan baku arsen 1000 mg/L ke dalam labu ukur 1 000 mL tambahkan 5 mL HNO₃ p.a. 5 mL encerkan dengan air suling bebas logam sampai tanda garis.
- e) Larutan standar arsen 2,5 µg/L ; 5 µg/L; 7,5 µg/L; dan 10 µg/L.
Pipet masing-masing 0 mL; 0,25 mL; 0,50 mL; 0,75 mL dan 1,00 mL larutan baku arsen 1 mg/L kedalam labu ukur 100 mL tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO₃ (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.6.3 Persiapan contoh

- a) Saring larutan contoh 50 mL sampai 100 mL menggunakan saringan membran 0,45 µm;
- b) asamkan contoh sampai pH < 2 dengan HNO₃ p.a;
- c) bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL
tambahkan 5 mL HNO₃ p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas penangas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL;
- d) pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO₃ (1,5 mL/L) sampai tanda garis;
- e) contoh siap diuji

A.6.4. Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan SSA generator uap hidrida.

A.6.5 Perhitungan

Hitung kadar cemaran As dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

A.7 Cemaran mikroba

A.7.1 Angka lempeng total

A.7.1.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 48 jam pada temperatur (35 ± 1) °C.

A.7.1.2 Peralatan

- a) Cawan petri dari gelas / plastik berdiameter 50 mm -60 mm;
- b) Pipet ukur 10 mL;
- c) Penangas air (45 ± 1)°C;
- d) Inkubator (35 ± 1) °C;
- e) Alat penghitung koloni;
- f) Autoklaf ;
- g) Saringan membran 0,45 µm;
- h) Gelas ukur 100 mL;

A.7.1.3 Pembenihan

Plate Count Agar (PCA).

A.7.1.4 Cara kerja

- Pasang peralatan penyaring membran yang terdiri dari corong, membran penyaring dan penampung yang telah disterilkan lebih dahulu dan hubungkan dengan sistem vakum ;
- masukkan 100 mL contoh atau sejumlah yang diperlukan ke dalam corong dari alat penyaring dengan menggunakan pipet atau gelas ukur steril.
- gunakan vakum untuk menyaring contoh melalui membran dan saring contoh seluruhnya;
- bilas seluruh permukaan dalam corong penyaring dengan air suling steril yang jumlahnya sama dengan jumlah contoh yang disaring, dan saring cairan pembilas;
- sesudah pembilasan selesai, hentikan vakum;
- buka kembali peralatan penyaring dengan pinset yang steril angkat membran penyaring dari alat penyaring;
- letakkan membran penyaring di atas perbenihan *plate count agar* dalam cawan petri (usahakan jangan ada gelembung udara di bawah membran);
- inkubasikan cawan petri dengan posisi terbalik dalam inkubator pada temperatur $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama 48 jam;
- hitung jumlah koloni yang terbentuk pada filter yang menyatakan jumlah angka lempeng total dalam 100 mL contoh, atau lanjutkan cara kerja ke butir j, jika diperlukan satuan hasil koloni/mL
- bagi koloni yang terbentuk pada filter dengan jumlah contoh yang disaring sehingga diperoleh hasil koloni/mL

A.7.2 Bakteri bentuk koli (*Coliform*)

A.7.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri bentuk koli setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang cocok selama 24 jam sampai 48 jam pada temperatur $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

A.7.2.2 Peralatan

- Inkubator $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, $(45,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$;
- Autoklaf;
- Rak untuk tabung reaksi;
- Pipet ukur 10 mL dan 1 mL steril berskala;
- Cawan petri dari gelas/plastik berdiameter 50 mm – 60 mm;
- Gelas ukur 100 mL; dan
- Saringan membran 0,45 μm

A.7.2.3 Perbenihan

- Violet red bile agar* ; dan
- Air suling

A.7.2.4 Cara kerja

- Pasang peralatan penyaring membran yang terdiri dari corong, membran penyaring dan penampung yang telah disterilkan lebih dahulu, dan hubungkan dengan sistem vakum;
- masukkan 100 mL contoh atau sejumlah yang diperlukan ke dalam corong dari alat penyaring dengan menggunakan pipet atau gelas ukur steril;
- gunakan vakum untuk menyaring contoh melalui membran dan saring contoh seluruhnya;
- bilas seluruh permukaan dalam corong penyaring dengan air pengencer atau air suling steril yang jumlahnya sama dengan jumlah cuplikan yang disaring dan saring cairan pembilas;
- sesudah pembilasan selesai, hentikan vakum;
- buka kembali peralatan penyaring dengan pinset yang steril dan angkat membran penyaring dari alat penyaring;
- letakkan membran penyaring di atas perbenihan *violet red bile agar* dalam cawan petri (usahakan jangan ada gelembung udara di bawah membran);
- inkubasikan cawan dengan posisi terbalik pada temperatur $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (24 - 48) jam; dan
- hitung koloni yang berwarna merah gelap yang berukuran 0,5 mm atau lebih pada membran, yang menyatakan jumlah bakteri koli dalam 100 mL contoh.

A.7.3 Salmonella sp**A.7.3.1 Prinsip**

Pertumbuhan Salmonella pada pembenihan selektif yang dilanjutkan dengan uji biokimia dan uji serologi.

A.7.3.2 Peralatan

- Inkubator, ($37 ^\circ\text{C}$, $42 ^\circ\text{C}$ dan $43 ^\circ\text{C}$);
- Tabung reaksi;
- Botol pengencer 500 mL;
- Tabung reaksi;
- Cawan petri 90 mm - 100 mm dan 140 mm – 150 mm;
- Gelas sediaan;
- Penangas air;
- Pengaduk gelas;
- Ose;
- Membran filter.

A.7.3.3 Perbenihan dan pereaksi

- Bismuth sulpit agar* (BSA);
- Brilliant green agar* (BGA);
- Buffered Peptone Water* (BPW);
- Pereaksi galakosidase;
- Pereaksi indol dan pembenihan indol;
- Lysine decarboxylation medium* (LDC);
- Nutrient agar*;
- Saline solution*;
- Selenite cystinebroth*;
- Semi solid nutrient agar*;
- Tetrathionate brilliany green broth*;
- Triple sugar iron* (TSI) agar;

- m) Urea agar atau urea broth;
- n) MR-VP medium;
- o) *Salmonella polyvalent* O;
- p) *Salmonella polyvalent* H (antisera spicer edwards);
- q) *XLD (Xylose lysine desoxycholate) agar*;
- r) *SSA (Salmonella shigella agar)*;
- s) *HE agar (Hekoen enteric agar)*.

A.7.3.4 Cara Kerja

- a) Penyiapan dan homogenisasi contoh;
 - b) Pra-pengkayaan (*pre-enrichment*);
 1. Pindahkan contoh yang telah dihomogenisasi secara aseptik ke dalam botol 500 mL steril.
 2. Kemudian inkubasikan pada temperatur (36 ± 1) °C selama 16 jam - 20 jam.
 - c) Pengkayaan (*enrichment*);
 1. Pipet 10 ml biakan pra-pengkayaan ke dalam 100 mL selenit cystine broth.
 2. Inkubasikan pada temperatur 35 °C – 37 °C selama 24 jam.
 3. Pipet 10 mL biakan pra-pengkayaan ke dalam 100 mL *tetrathionate Brilliant Green Broth* (BGA).
 4. Inkubasikan pada temperatur 43°C selama 24 jam.
 - d) Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif;
 1. Pindahkan biakan pengkayaan dengan menggoreskan masing-masing biakan dengan sengkeli ke dalam cawan petri yang berisi BGA dan BSA atau perbenihan selektif lainnya (XLD, HE agar, SS Agar).
 2. Inkubasikan pada temperatur 37 °C selama 24 jam.
 3. Amati tersangka koloni salmonella pada media dengan ciri-ciri sebagai berikut :

BGA	: Koloni yang berwarna merah muda hingga merah atau bening hingga buram dengan lingkaran merah muda sampai merah.
BSA	: Koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Warna media disekitar koloni mula-mula coklat dan kemudian menjadi hitam, jika masa inkubasi bertambah. Pada beberapa "strain" koloni berwarna hijau dengan daerah disekelilingnya berwarna lebih gelap.
XLD	: Koloni berwarna merah muda dengan bintik hitam di tengah.
HE	: Koloni berwarna biru-hijau dengan atau tanpa bintik hitam ditengah.
SSA	: Koloni tak berwarna sampai merah muda, bening sampai buram.
 - e) Konfirmasi atau penegasan (uji biokimia);
 1. Pilih 2 – 5 koloni tersangka dan goreskan pada permukaan nutrien agar dalam cawan petri yang sudah disiapkan terlebih dahulu dan inkubasikan pada temperatur 37 °C selama 20 jam– 24 jam
 2. Dari koloni yang diisolasi pada nutrien agar dipindahkan ke dalam media sebagai berikut ;
- A. TSI Agar
1. Tersangka koloni salmonella dipindahkan keperbenihan miring TSA dengan cara menggores bagian miringnya dan menusuk bagian tegaknya
 2. Inkubasikan pada temperatur 37 °C selama 24 jam - 48 jam
 3. Amati terjadinya perubahan – perubahan sebagai berikut;
- Pada bagian tegaknya salmonella akan:
- memfermentasikan glukosa, warna media berubah dari ungu menjadi kuning
 - Tidak memfermentasikan sakarosa media tetap ungu
 - Dapat membentuk gas H₂S, warna media berubah dari ungu menjadi hitam

Pada bagian miringnya salmonella akan:

- Dapat memfermentasikan laktosa atau sakarosa warna media menjadi kuning
- Tidak dapat memfermentasikan laktosa atau sakarosa, warna media tetap
- merah atau tidak berubah

B. Urea agar

1. Goreskan tersangka koloni salmonella pada permukaan Urea agar miring .
2. Inkubasikan pada temperatur 37 °C selama 24 jam. Timbulnya warna merah muda menunjukkan reaksi positif dan warna tidak berubah reaksi negatif.

C. *Lysine Decarboxylation Medium*

1. Inokulasikan tersangka koloni salmonella pada perbenihan cair (*lysine decarboxylase broth*).
2. Inkubasikan pada temperatur 37 °C selama 48 jam. Timbulnya warna ungu menunjukkan reaksi positif.

D. *Beta Galaktosidase Reagent*

1. Suspensikan tersangka koloni salmonella dalam 0,25 larutan saline dalam tabung reaksi.
2. Tambahkan 1 tetes toluena.
3. Masukkan ke dalam penangas air pada temperatur 37 °C selama beberapa menit.
4. Tambahkan 0,25 mL pereaksi *Betagalactosidase* dan kocok.
5. Simpan lagi dalam penangas air pada temperatur 37 °C selama 24 jam. Terbentuknya warna kuning menunjukkan reaksi positif dan bila tidak berubah reaksi negatif.

E. VP Medium

1. Masukkan masing-masing 1 sengkeli tersangka koloni salmonella ke dalam 2 tabung reaksi yang masing-masing berisi 0,2 mL perbenihan VP.
2. Inkubasikan tabung ke 1 pada temperatur kamar dan tabung ke 2 pada temperatur 37 °C selama 48 jam.
3. Kemudian pada tiap tabung tambahkan 2 tetes larutan creatine, 3 tetes larutan alphanafol dan 2 tetes pereaksi KOH lakukan pengocokan tiap kali menambahkan pereaksi.
4. Amati dalam waktu 15 menit. Terbentuknya warna merah jambu sampai merah tua menunjukkan reaksi positif dan bila tidak berubah reaksi negatif.

F. Indol Medium

1. Masukkan 1 sengkeli tersangka koloni salmonella ke dalam media indol tabung.
2. Inkubasikan pada temperatur 37 °C selama 24 jam lalu tambahkan 1 mL pereaksi indol.
3. Terbentuknya warna gelang merah menunjukkan reaksi positif dan bila tidak berubah atau warna kuning kecoklatan reaksi negatif.

Reaksi biokimia dari salmonella

a. TSI agar

Bagian tegaknya : warna kuning dengan atau tanpa warna hitam (H₂S)

Bagian miringnya : warna merah atau tidak berubah

b Urea agar : warna merah atau tidak berubah (reaksi negatif)

c. *Lysine decarboxylase* : warna ungu (reaksi positif)

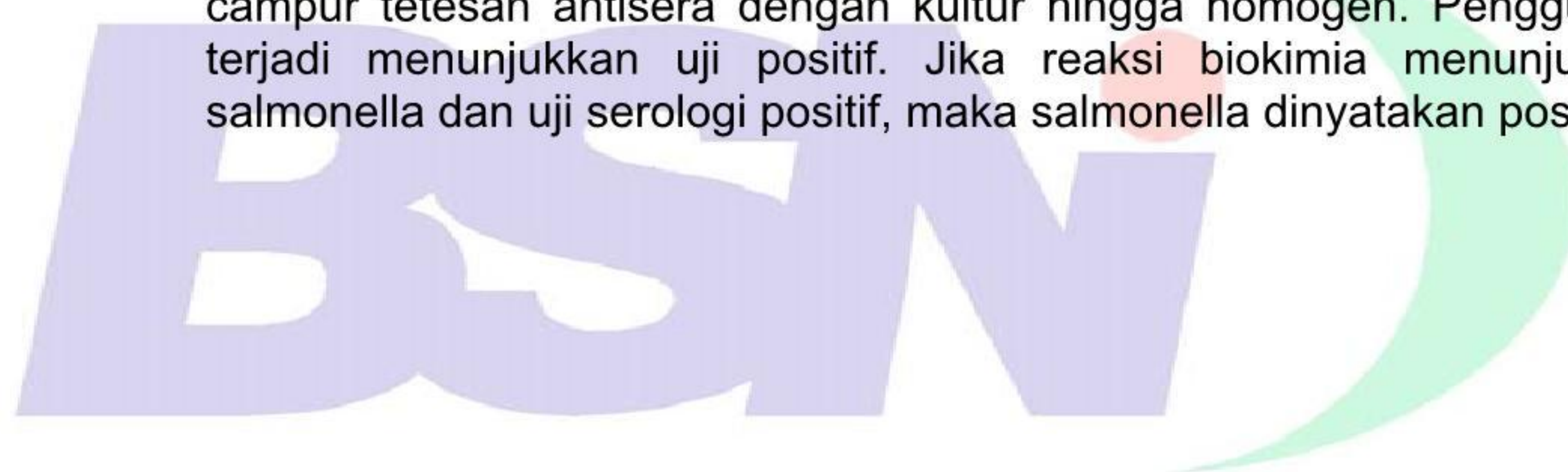
d. *Beta-galactosidase* : warna tidak berubah (reaksi negatif)

e. Uji vogel-proskuer : warna tidak berubah (reaksi negatif)

f. Uji indol : warna kuning kecoklatan (reaksi negatif)

Uji serologi

Lakukan uji serologi bila reaksi biokimia menunjukkan ada salmonella. Ambil 1 sengkeli biakan dari TSI agar dan oleskan pada gelas sediaan. Kemudian teteskan sedikit antisera di samping biakan. Dengan menggunakan segkeli (ose) campur tetesan antisera dengan kultur hingga homogen. Penggumpalan yang terjadi menunjukkan uji positif. Jika reaksi biokimia menunjukkan adanya salmonella dan uji serologi positif, maka salmonella dinyatakan positif.



Bibliografi

Association of Official Analytical Chemist. 2005. *AOAC Official Method 940.17 Carbon Dioxide in Beer*, 18th Edition, Chapter 27.1.30.

Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 492/MENKES/PER/IV/2010 tentang Persyaratan Kualitas Air Minum.

American Public Health Association, 2005, Standar Methods for the Examination of Water and Waste water. yaitu:

Method 3113 B. Electrothermal Atomic Absorbtion Spectrometric Method.

Method 3114. Arsenic and Selenium by Hydride Generation/Atomic Absorption Spectrometry.

Method 2540 B. Total Solids Dried at 103-105 °C .

Method 9215. Heterotrophic Plate Count. D. Membrane Filter Method.

Method 9222. Membrane Filter Technique for Members of the Coliform Group .

Method 9260. Detection of Pathogenic bacteria. B. General Qualitatif Isolation and Identification Procedure for Salmonella.

SNI 3553, *Air minum dalam kemasan.*